

THESIS

MUNICH

1966

EINE NEUE AUSWERTMÖGLICHKEIT
IN DER PAPIERELEKTROPHORESE
VERSUCHE ZU EINER ELEKTROMETRISCHEN METHODE

Gisela Voigt

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR DRIVE
PALO ALTO, CALIF.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153723_0144

AUS DER II. MEDIZINISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Direktor: Professor Dr. Dr. G. Bodechtel

EINE NEUE AUSWERTMÖGLICHKEIT
IN DER PAPIERELEKTROPHORESE
VERSUCHE ZU EINER ELEKTROMETRISCHEN METHODE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Gisela Voigt
aus Hannover

München 1966

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent:	Professor Dr. O. WIELAND
Correferent:	Professor Dr. Dr. G. BODECHTEL
Dekan:	Professor Dr. R. ZENKER

Tag der mündlichen Prüfung: 5. Juli 1966

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG

BISHERIGE METHODEN

PROBLEMSTELLUNG

THEORETISCHE GRUNDLAGEN

- physikalisch-chemische Eigenschaften der Serumproteine
- physikalisch-chemische Eigenschaften des Trägermaterials
- Leitfähigkeitsmessung, Widerstandsmeßgerät

VERSUCHE ZU EINER ELEKTROMETRISCHEN METHODE

- Meßelektroden

 - Bananenstecker, Federzungenelektroden, Punktelektroden

- Aufstellung konstanter Meßbedingungen
- Prüfung des Trägermaterials

ERGEBNISSE

- Leitfähigkeit von Serum

 - photometrischer Vergleich

- absolute Albumin- und Globulinleitfähigkeit
- Auswertung von Elektrophoresestreifen

 - photometrischer Vergleich

DISKUSSION

ZUSAMMENFASSUNG

LITERATUR

LEBENS LAUF

EINLEITUNG

Die ersten Angaben, bei analytischen Verfahren Papier als Trägermedium zu verwenden, stammen von Paulo König (16) und wurden im Jahre 1937 veröffentlicht. Er stand damals vor der Entscheidung seine Versuche mit dem Gift der südamerikanischen Schlange *Bothrops jaracaca*, wegen der Knappheit des zur Verfügung stehenden Materials entweder ganz einzustellen oder den Verbrauch bedeutend einzuschränken.

Bei den bis dahin verwendeten Methoden - Fraktionierung mit Ammonsulfat, Elektrodialyse in Mehrzellenapparaten mit dazwischengeschalteten abgestuften Membranen - war der Verbrauch unzulässig groß.

Es mußte eine Methode gefunden werden, die es einerseits erlaubte mit wenigen Tropfen Material zu arbeiten, andererseits dabei ausreichend genau war. Auf diese Weise entstand, praktisch aus einer Notlage heraus, die Elektrophorese auf Papier.

Einige Jahre später berichten Consden, Gordon und Martin (6) mit ihrer Arbeit "Quantitative Analysis of Proteins: A Partition Chromatographic Method Using Paper" zum ersten Mal von einer weiteren analytischen Methode mit Papier als Trägermedium, der Papierchromatographie.

Die zahlreichen Vorschläge in den letzten Jahren zur Verbesserung und Vereinfachung des Verfahrens der Papierelektrophorese betreffen einerseits die Durchführung der Elektrophorese und die dafür verwendeten Anordnungen, andererseits die verschiedenen Möglichkeiten zur Darstellung und Auswertung der auf dem Papier aufgetrennten Serumproteine.

BISHERIGE METHODEN

Von den vielen Arbeiten, die auf diesem Gebiet bereits erschienen sind, seien die bedeutendsten kurz in ihrem Prinzip aufgezeigt.

I PHOTOMETRIE

Die allgemein bekannteste Auswertmethode ist die photometrische, bei der drei verschiedene Verfahren entwickelt wurden:

Einmal die Auswertung durch Elution des Farbstoffes und nachfolgende kolorimetrische Messung mit dem Photometer (3, 7). Bei dieser Methode werden die angefärbten Eiweißfraktionen ausgeschnitten, fraktionsweise in n 1/10 Natronlauge eluiert und die Extinktionswerte bestimmt. Doch liegen hier die Ergebnisse für eine Fraktion nur als einzelne Zahlenangabe vor, so daß die in der Elektrophorese bekannten Gauß'schen Kurven nicht dargestellt werden können. Man behilft sich hier mit der Aufzeichnung von Säulen, entsprechend den Extinktionswerten, auf kariertem Papier (Abb. 1).

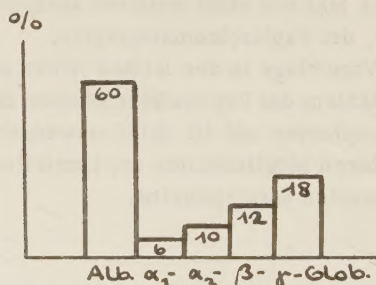


Abb. 1 Elutionsmethode

Das heute geläufigste photometrische Auswertverfahren, nach Grassmann, Hannig, Knedel (8) beruht auf der direktphotometrischen Bestimmung der Lichtabsorption im transparentgemachten Streifen. Die nach elektrophoretischer Trennung mit Amidoschwarz gefärbten und getrockneten Streifen werden transparent gemacht mit einer Mischung auf Paraffinöl und Bromnaphthalen im Verhältnis 1:1. Die Transparenz der im durchscheinenden Licht auszuwertenden Streifen ist unbedingt erforderlich, denn sie erhöht die Lichtdurchlässigkeit gegenüber einem unbehandelten Streifen um nahezu 100 % (9). Die zur Messung der Lichtabsorption entwickelten Geräte arbeiten alle nach dem gleichen Prinzip. Der auszuwertende Streifen wird an einem 1 mm breiten Lichtspalt vor-

beigeführt, der durch monochromatisches Licht ausgeleuchtet wird, das mit seinem Wellenbereich im Absorptionsmaximum des zur Darstellung der Eiweißfraktion verwendeten Farbstoffes liegt (7).

Als dritte Möglichkeit einer Auswertung der gefärbten Streifen wurde in der Literatur mehrfach die Photometrie des an der Streifenoberfläche reflektierten Lichtes angegeben (10, 26, 27). Diese Methode konnte sich aber bisher, wegen der noch ungenügend definierten Fehlerquellen nicht durchsetzen.

II RETENTIONSANALYSE

Auf einem ganz anderen Prinzip beruht die retentionsanalytische Auswertung nach Wieland-Fischer-Wirth (33). Dabei wird die Erscheinung ausgenutzt, daß eine Lösung, die mit Protein reagiert, in proteinfreiem Papier schneller ansteigt, als in proteinhaltigen Papierflächen. Die aufsteigende Lösung wird dort, wo sie entsprechend der Konzentration des Proteins reagiert, zurückgehalten (= Retention). Hierdurch entstehen in den aufsteigenden Fronten der reagierenden Lösung charakteristische Aussparungen, die Lage und Menge der Proteinfractionen angeben (Abb. 2).

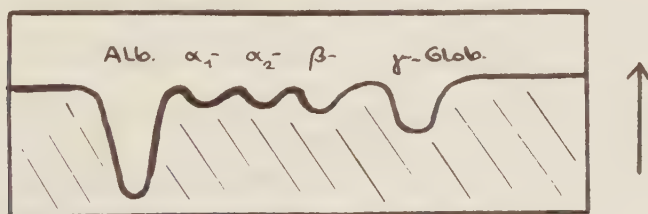


Abb. 2 Retentionsanalyse

III ISOTOPENMARKIERUNG

Zahlreiche Arbeiten beschäftigen sich mit der papierelektrophoretischen Auftrennung von Gemischen, bei denen eine oder mehrere Komponenten mit radioaktiven Isotopen markiert sind (5, 13, 18). Zur Auswertung der Aktivitätsverteilung auf dem Papierstreifen, auch für Chromatographie, wurde ein vollautomatisches Gerät entwickelt, das mit einem Transportvorschub von 120 mm/Std arbeitet. Die Zeit für eine vorgewählte Impulszahl wird automatisch aufgeschrieben.

IV FLUORESZENZMESSUNG

Eine weitere Veröffentlichung berichtet von der Fluoreszenzmessung im Filterpapierstreifen (29): Wird ein fluoreszierender Stoff mit UV-Licht bestrahlt, so entsendet er Strahlen sichtbarer Wellenlänge. Diese Strahlenumwandlung wird in einer entsprechenden Apparatur ausgenützt, um durch einfache photometrische Messung die Menge eines fluoreszierenden Stoffes nach seiner elektrophoretischen Trennung auf Filterpapier zu bestimmen.

PROBLEMSTELLUNG

Dieser Überblick mag zeigen, daß schon viele Wege beschritten wurden, den Anforderungen einer klinischen Routineuntersuchung, wie der papierelektrophoretischen Serumeiweißanalyse, gerecht zu werden. Allgemein ist dabei nach einer materialsparenden und doch empfindlichen, einfach durchzuführenden und zeitsparenden Methode mit möglichst geringem apparativem Aufwand zu trachten. Eine Möglichkeit, diese Bedingungen zu erfüllen, war bisher noch nicht aufgegriffen worden: der Nachweis der Serumproteine auf Papier durch Messung ihrer elektrischen Leitfähigkeit.

THEORETISCHE GRUNDLAGEN

Maßgebend für den Nachweis der Leitfähigkeit sind die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Serumproteine, die sie als Elektrolyte, als Dipole, mit ihrer unterschiedlichen Löslichkeit, ihrer Größe und ihrem Molekulargewicht haben und die auch bestimmend für die papierelektrophoretische Trennung sind.

Die Eigenschaften als Elektrolyte (19) liegen zum größten Teil in den Seitenketten der peptidartig aneinandergeknüpften Proteinbausteine, den Aminosäuren. (Der Anteil der freien Endgruppen der Peptidketten fällt bei der Gesamtheit der ionisierbaren Gruppen kaum ins Gewicht). Dabei tragen die sauren Carboxylgruppen in den Seitenketten der Glutamin- und Asparaginsäure (außerdem Phenol- und SH-Gruppen) negative Ladungen, die basischen Gruppen von Lysin, Arginin und Histidin (Ammonium-, Guanidium- und Imidazoliumionen) positive Ladungen. Den Anteil dieser Aminosäuren an den einzelnen Serumproteinfractionen veranschaulicht folgende Übersicht (Tab. 1) (1).

	Albumin	α -Globulin	β -Globulin	γ -Globulin
Glutaminsäure	17,4	21,6	14,5	11,8
Asparaginsäure	10,4	9,0	9,8	8,8
Lysin	12,3	8,9	6,6	8,1
Arginin	6,2	7,7	6,8	4,8
Histidin	3,5	2,8	2,8	2,5

Tab. 1 Aminosäuregehalt in g/100 g Serumprotein

Der Gesamt-Ladungszustand ist jeweils von dem pH der Lösung abhängig. Bei einem niedrigen pH (Überschuß an H^+ -Ionen) wird die Dissoziation der sauren Gruppen zurückgedrängt, bei hohem pH gefördert. Danach ist bei einem bestimmten pH-Wert die Zahl der positiven und negativen Ladungen gleich groß und die Eiweißmoleküle verhalten sich nach außen hin neutral (= isoelektrischer Punkt = IEP). Bei jedem pH-Wert, der kleiner als der IEP ist, übersteigt die Zahl der positiven Ladungen diejenige der negativen, das Protein liegt also als Kation vor. Bei pH-Werten, die größer als der IEP sind, ist das Protein dagegen als Anion vorhanden. So liegt vergleichsweise der IEP für Albumin bei pH 4,6, der des γ -Globulin zwischen pH 6,8 und 7,3 (1).

Nicht nur die Zahl der elektrischen Ladungen, sondern auch deren Stellung zueinander im Molekül spielt eine Rolle. So erzeugt das Eiweißmolekül als Dipol (35) ein seiner beträchtlichen Dimension und der großen Zahl ionisierter Gruppen entsprechendes zusätzliches elektrisches Feld. Beispielsweise hat das γ -Globulinmolekül mit seiner ausgesprochen asymmetrischen Ladungsverteilung ein Dipolmoment, das etwa dreimal so groß ist wie jenes des Albuminmoleküls, das fast symmetrisch gebaut ist.

Die Löslichkeit (19) der Proteine wird von verschiedenen Faktoren (Salzkonzentration, pH, Natur des Salzes) bestimmt. In wässrigen Lösungen mit steigenden Salzkonzentrationen zeigt die Löslichkeit der Proteine einen ganz charakteristischen Verlauf. Sie steigt in Lösungen mit geringer Salzkonzentration zunächst an, erreicht ein Maximum, um bei weiter zunehmender Konzentration wieder abzunehmen ($\rightarrow$ Aussalzung). Da die Ionisation der sauren und basischen Gruppen von der Reaktion der Lösung abhängt, variiert die Löslichkeit mit dem pH. In der Regel ist ein Protein umso leichter in Wasser löslich, je größer die Zahl der ionisierten Gruppen ist. Die Natur des Salzes, seine Ionenstärke, stellt eine weitere wichtige Größe bei der Löslichkeitserhöhung dar, denn die lösende Wirkung der Ionen wächst mit dem Quadrat ihrer Wertigkeit.

Von den Serumproteinen ist das Albumin bereits in reinem Wasser löslich,

Globulin dagegen erst in Lösungen mit schwacher Salzkonzentration.

Eine exakte Messung der Größe von Proteinmolekülen wurde durch die Ultrazentrifuge von Svedberg (30) ermöglicht. Es ist plausibel, daß ein Protein umso schneller sedimentiert, je schwerer seine Teilchen sind, d. h. je höher sein Molekulargewicht ist. Auf diese Weise läßt sich aus der Sedimentationsgeschwindigkeit bezogen auf die Einheit der Zentrifugalbeschleunigung, das Molekulargewicht (15) errechnen. Es beträgt für das elliptische Albuminmolekül (von etwa 150 Å Länge und einem Achsenverhältnis von 4:1) 69000, für das γ -Globulinmolekül 156000 und für das kugelförmige β_1 -Lipoprotein 1300000.

 Albumin

 γ -Globulin

 β_1 -Lipoprotein

Die papierelektrophoretische Trennung der Serumproteine (2, 34) erfolgt in einem Gleichstromfeld, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit 1. von der elektrischen Ladung der Teilchen, 2. von der angelegten Spannung abhängt (25). Die elektrische Ladung der in Lösung befindlichen Serumproteine wird durch ein genau definiertes und während der Trennung konstantes pH bestimmt. Es wird im allgemeinen mit dem Michaelis-Puffer im leicht alkalischen Bereich (jenseits des IEP aller Serumproteine) bei pH 8,6 und einer Ionenstärke $\mu = 0,1$ gearbeitet. Bei diesem pH sind alle Teilchen negativ geladen und wandern zur Anode.

Die angelegte Feldstärke (V/cm) steht in direkter Beziehung zur Beweglichkeit der Proteinmoleküle und bestimmt so, neben den Eigenschaften des Trägers, die Wanderungsgeschwindigkeit.

Mitbestimmend bei der Leitfähigkeitsmessung sind neben den bisher genannten Faktoren, auch die physikalisch-chemischen Eigenschaften des für das Protein verwendeten Trägermaterials (31), des Filterpapierstreifens (Filterpapier 2043 a der Fa. Carl Schleicher u. Schüll, Dassel/Kr. Einbeck), oder der, wie sich im Laufe der Arbeit dann ergeben hat, vorteilhafteren Celluloseacetatfolie (Membranfolie zur Elektrophorese der Fa. Carl Schleicher u. Schüll). Die Vorzüge dieser Folien liegen in ihrem chemisch einheitlichen Material mit minimalen Unreinheiten, ihrer mikroskopisch feinen Mem-

branstruktur mit einem definierten Porendurchmesser von etwa $3\text{ }\mu$, einer Schichtdicke von $150\text{--}200\text{ }\mu$ und einem Porenvolumen von ca. 85 %. Sie sind, verglichen mit dem Baumwoll-Linters-Filterpapier, weniger hygroskopisch und zeigen bei der Elektrophorese eine schärfere Auftrennung der einzelnen Proteinfractionen infolge der geringeren Adsorptionstendenz und vergleichbare Werte mit der trägerlosen Elektrophorese durch Fehlen der "Albuminschleppe" (17).

Leitfähigkeitsmessung Widerstandsmeßgerät

Zum Nachweis der Leitfähigkeit bot sich, wegen der zu erwartenden sehr kleinen Werte ein Megohmmeter (Taschenmegohmmeter Type MOM 2 T der Wissenschaftlich Technischen Werkstätten, Weilheim/Oberbayern) an.

Einige wenige physikalische Angaben zur Widerstandsmessung (22) mögen die Vorstellung erleichtern.

Wird zwischen zwei Elektroden von der Fläche F und dem Abstand r ein Leiter von dem spezifischen Widerstand ϱ gebracht, so läßt sich zwischen den Elektroden ein Widerstand R messen, für welchen die Beziehung

$$R = \frac{\varrho \cdot r}{F}$$

gilt.

In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Elektroden erprobt und als Meßgerät ein Megohmmeter, welches nach der Spannungsteilmethode arbeitet, verwendet (Abb. 3). Die Betriebsspannung U beträgt $17,5\text{ V}$. Für diese Methode gilt unter Anwendung des Ohm'schen Gesetzes:

$$U_1 : U = R_1 : (R_1 + R_2)$$

oder

$$U_1 = U \frac{R_1}{R_1 + R_2}$$

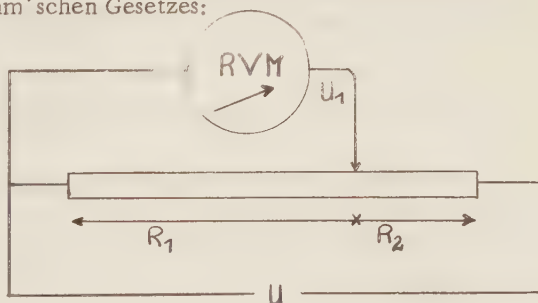


Abb. 3 Prinzip des Megohmmeters

Dabei wird die Teilspannung U_1 von einem direkt in Megohm geeichten Röhrenvoltmeter abgelesen.

VERSUCHE ZU EINER ELEKTROMETRISCHEN METHODE

I MESSELEKTRODEN

Der erste Versuch, der überhaupt einmal zeigen sollte, ob der Nachweis der Leitfähigkeit von Protein auf der Oberfläche eines Trägers prinzipiell möglich ist, wurde an einem ungefärbten Elektropherogramm vorgenommen. Zur Erhöhung der Leitfähigkeit wurde das trockene Papier mit 1%iger Essigsäure angefeuchtet. Dann wurde der Streifen auf eine Glasplatte aufgelegt und mit zwei einfachen, an ein Ohmmeter angeschlossenen Bananensteckern als Elektroden, millimeterweise fortschreitend abgegriffen. Ein gleichmäßiger Andruck der Elektroden war dabei besonders wichtig. Drei Zonen, die sich nach Anfärbung mit der Albumin-, β -Globulin- und γ -Globulinfraktion als identisch erwiesen, zeigten am Ohmmeter eine Erhöhung des Widerstandes gegenüber der proteinfreien Papierfläche an (Abb. 4).

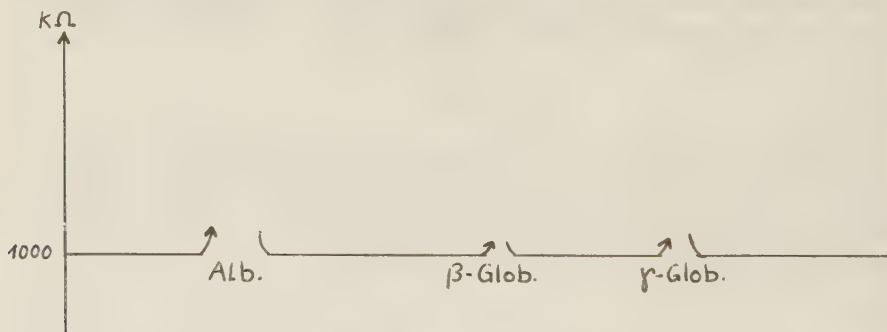


Abb. 4 Erster Versuch mit Bananensteckern als Elektroden

Nach diesem Grundversuch galt es nun, einmal geeignetere Elektroden zu finden und zum anderen exakt definierte, scharf begrenzte Eiweißzonen auf das Papier aufzubringen. Die bereits in der Technik zur Messung des Widerstandes von Festkörpern, speziell Folien, verwendeten Feder-Zungenelektroden aus Neusilber mit 2 mm Abstand schienen sich für unsere Zwecke zu eignen. Das bei den ersten Versuchen benützte Filterpapier wurde in der Folgezeit von der viel feiner strukturierten, homogenen Celluloseacetatfolie (CAF) abgelöst. Die trockene, unbehandelte Folie wurde mit je einem Tropfen (entsprechend 0,01 ml) einer steigenden Konzentrationsreihe von Humanserum beschickt. Das Verhältnis Serum zu Aqua dest. war für die 6 Punkte, wie in Abb. 5 angegeben.

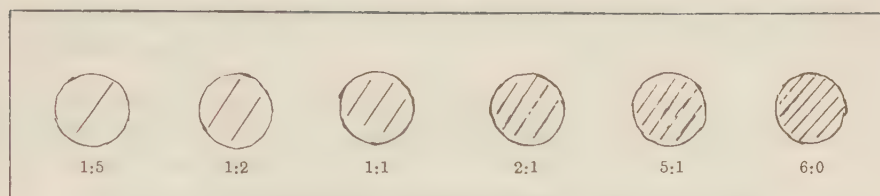


Abb. 5 Steigende Konzentrationsreihe Humanserum

Nachdem die Tropfen luftgetrocknet waren, wurde der Streifen auf die Zungenelektroden aufgelegt und von oben mit einem Gewicht beschwert, was einen gleichmäßigen Andruck garantierte (Abb. 6). Der Papierstreifen wurde jeweils nach Anheben des Gewichtes um 2 mm weitergerückt.

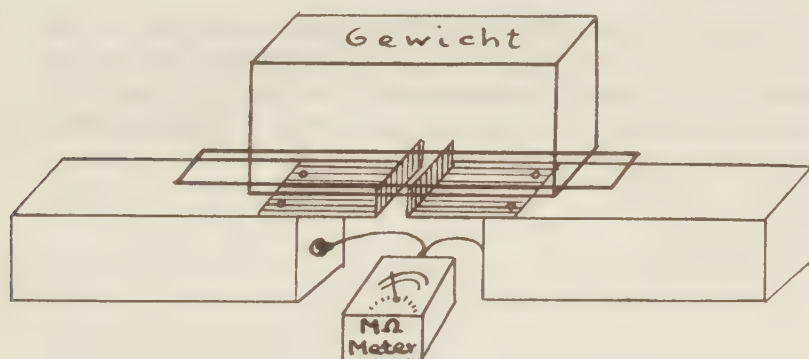


Abb. 6 Meßvorrichtung mit Federzungenelektroden

Die vom Megohmmeter abgelesenen Meßwerte ergaben die in Abb. 7 dargestellte Kurve, die bei mehrfacher Wiederholung reproduzierbar war. Doch fand bei diesem Vorgehen eine Umkehr der Verhältnisse statt, die sich im ersten Versuch dargeboten hatten. Auf diesem Streifen nahm der Widerstand mit größerer Eiweißkonzentration ab, also die Leitfähigkeit zu.

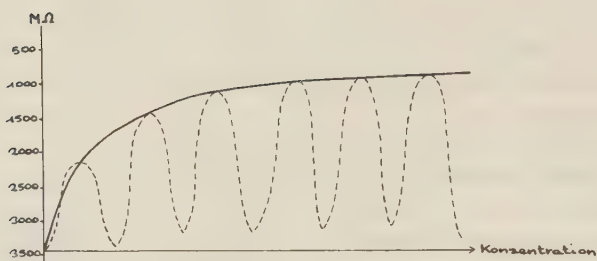


Abb. 7 Widerstandsmessung mit Federzungenelektroden

Das Durchmessen eines ungefärbten Elektropherogramms auf Filterpapier wies wieder dieselben Verhältnisse wie im Grundversuch auf: Anstieg der Widerstandswerte mit höherer Eiweißkonzentration, also Abfall der Leitfähigkeit. Der Kurvenverlauf des ungefärbten Elektropherogramms entsprach ungefähr dem eines photometrisch ausgewerteten Streifens (Abb. 8).

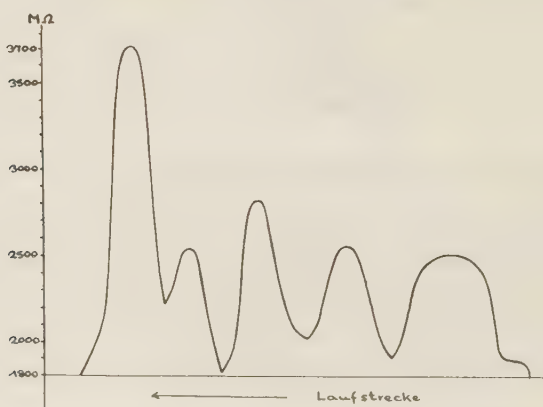


Abb. 8 Widerstandsmessung eines Elektropherogramms

Im Laufe der Zeit stellten sich jedoch bei dieser Meßanordnung einige Mängel heraus, die bei der weiteren Entwicklung zu berücksichtigen waren. Sie betrafen:

1. die Elektroden selbst, die zwar mit ihrer Breite den gesamten Streifen erfassen, doch die Grenze proteinfreies Papier/Eiweißzone nicht genau darstellen konnten (Abb. 9 a).

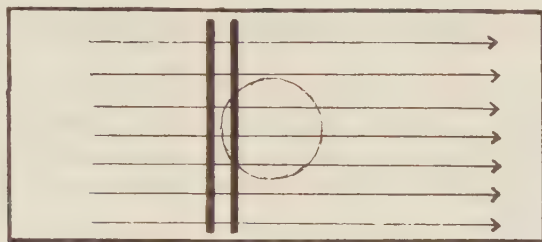


Abb. 9 a Federzugenelektroden

Bei den folgenden Versuchen ermöglichten Punktelektroden, in Form von zwei an einer Halteplatte fest angebrachten, in sich federnden Cu-Blech-Elektroden mit einer punktförmigen Auflagefläche eine exakte Erfassung der Grenze proteinfreies/proteinhaltiges Papier (Abb. 9 b).

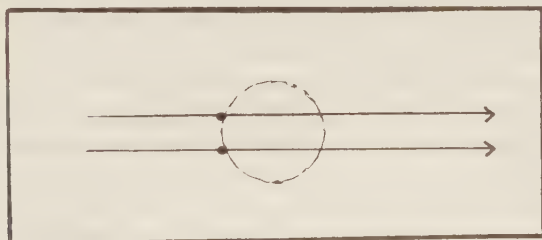


Abb. 9 b Punktelektroden

2. war der bisher mit der Hand getätigte millimeterweise Vorschub des zu messenden Streifens ungenau und sehr zeitraubend, was einen automatischen bzw. halbautomatischen Transport als wünschenswert erscheinen ließ.
3. zeigten sich bei der differierenden Temperatur und Luftfeuchtigkeit des Arbeitsraumes unterschiedliche Meßwerte.

4. war der störende Einfluß anderer im Arbeitsraum befindlicher elektrischer Geräte sowie Luftströmungen im Raum, auf das sehr empfindliche Megohmmeter, beträchtlich.

Diese Punkte waren richtunggebend für die Wahl konstanter Meßbedingungen und die im folgenden beschriebene Meßanordnung.

II AUFSTELLUNG KONSTANTER MESSBEDINGUNGEN

Als halbautomatisches Transportgerät bot sich uns ein bereits vorhandener, in der Photometrie verwendeter Millimeter-Vorschub (Zusatzteil zum Photometer Eppendorf) an. Dabei war der Meßstreifen auf einer festjustierten Glasplatte anzukleben, die mittels einer handbetriebenen Kurbel unter den Elektroden durchgezogen wurde.

Die störenden Einflüsse durch andere elektrische Meßgeräte wurden mit einem über die Elektroden und das Meßgut gesetzten Faraday'schen Käfig behoben. Der engmaschige Drahtgitterkäfig wurde zur Verhütung von Oxydation, die seine Wirkung wieder zunichte machen würde, verkadmirt.

Der soweit arbeitsfähige Meßapparat wurde nun noch in eine luftdicht abgeschlossene Kammer gestellt. Darin sorgen 4 mit entsprechenden Lösungsmitteln zu füllende Petrischalen für eine genau definierte Feuchtigkeit. Die Eichkurven von kaltgesättigter $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ -Lösung und Wasser mit einem Leerstreifen veranschaulichen die Bedeutung einer konstant feuchten Kammer für die Leitfähigkeit des zu messenden Stoffes (Abb. 10).

Für die Luftfeuchtigkeit des Arbeitsraumes, die bei 20°C 35 % betrug, waren die gemessenen Widerstandswerte am höchsten, dabei aber so inkonstant, daß die Aufstellung einer Eichkurve nicht möglich war. In einer feuchten Kammer mit kaltgesättigter Na-dichromatlösung stieg die Leitfähigkeit des Leerstreifens innerhalb der ersten 5 Stunden steil an und hatte nach 7 Stunden mit 51 % Feuchte bei 20°C ihr Maximum erreicht, das sich auch nach 24 Stunden nicht mehr änderte. Mit Aqua dest. wurde bereits nach 2 Stunden bei 70 % Feuchte und 19°C Vollsättigung erreicht.

Die Leitfähigkeit lag schon nach 1/2 Stunde weit über der des Na-dichromats und bei Sättigung um eine Zehnerpotenz höher.

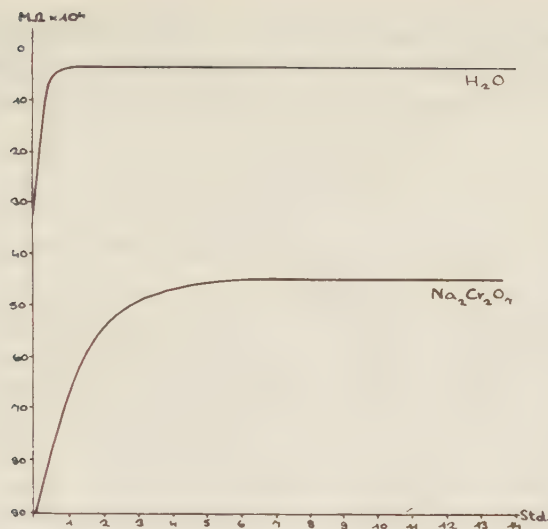


Abb. 10 Eichkurven für kaltgesättigte $Na_2Cr_2O_7$ -Lösung u. Wasser

Mit den punktförmigen Elektroden waren nun entsprechend der Formel: $R = \frac{\rho \cdot l}{F}$ viel größere Widerstandswerte zu erwarten. Damit erweiterte sich der gesamte Meßbereich. Eine stärker verdünnte Meßreihe mit dem Verhältnis Serum/Aqua dest. 1:9, 1:4, 1:3,5, 1:1,5, 1:1, 1,5:1 zeigte, daß noch geringere Proteinkonzentrationen nachweisbar sind. Es wurden diesmal 0,01 ml Lösung mit einer feinen Pipette in Form von elektrophoretisch aufgetrennten Fraktionen bandförmig aufgetragen (Abb. 11).

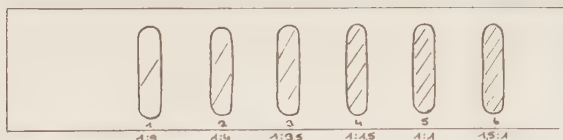


Abb. 11 Steigende Proteinkonzentration auf Celluloseacetatfolie

10 auf diese Weise beschickte und unter denselben Bedingungen gemessene Celluloseacetat-Streifen ergaben folgenden reproduzierbaren Kurvenverlauf (Abb. 12).

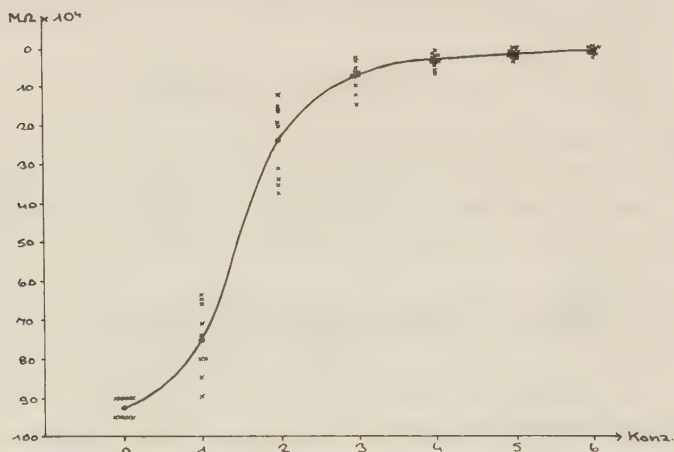


Abb. 12 Messung steigender Proteinkonzentrationen mit Punktelektroden

III PRÜFUNG DES TRÄGERMATERIALS

Mit dieser Meßanordnung war auch eine exakte Prüfung des Trägermaterials möglich und die Vorzüge der Celluloseacetatfolie gegenüber Filterpapier konnten bestätigt werden. Der Leerstreifen Schleicher-Schüll-Filterpapier 2043a streute dabei sehr stark, was auf seine grobe Struktur zurückzuführen sein dürfte. Die Celluloseacetatfolie dagegen weist nur geringe Schwankungen ihrer Widerstandswerte auf (Abb. 13).

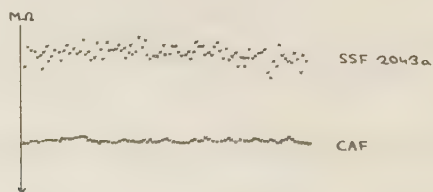


Abb. 13 Streuung der Widerstandswerte von SSF und CAF

Allerdings zeigte sich im Laufe der Zeit, daß die Leerwerte bei den verschiedenen Packungen Celluloseacetatfolie nicht konstant sind, sondern wechselnd zwischen 40×10^4 und 100×10^4 Mega-Ohm liegen.

ERGEBNISSE

I LEITFÄHIGKEIT VON SERUM

Nach dem grob orientierenden Versuch von Seite 18 galt es nun, den Meßbereich genauer darzustellen, in dem eine direkte, lineare Beziehung von Serumproteinkonzentration zur Leitfähigkeit besteht. Es wurde normales Serum mit einem Refraktometerwert von 8,0 g % verwendet. 5 Cellulose-Acetatfolien wurden dieses Mal mit folgender Konzentrationsreihe Serum/Aqua dest. 2/18, 3/17, 4/16, 5/15, 6/14, 7/13, 8/12 wie o. a. beschickt, über Nacht in einem Trockenschrank bei 38°C getrocknet, am nächsten Tag entsprechend der aufgestellten Eichkurve über 10 Stunden in der Na-dichromatfeuchten Meßkammer bei 53 % Luftfeuchtigkeit und 21°C Temperatur gleichmäßig gesättigt und dann millimeterweise unter den 2 feststehenden Punktelektroden durchgezogen. Die nach jedem Millimeter am Mega-Ohmmeter abgelesenen Werte zeigten die den steigenden Konzentrationen Serum entsprechenden Widerstandsänderungen an (Abb. 14a). (Meßvorrichtung siehe Abb. 15).

Daraufhin wurden dieselben 5 Cellulose-Acetatfolien mit Amidoschwarz 10B (0,5 %ige Lösung in Methanol-Eisessig = 9/1) 10 Minuten lang angefärbt, 20 Minuten in Methanol/Eisessig (9/1) entfärbt, auf eine Glasplatte gespannt und mit einer Sprühlösung (Aethylacetat/Dioxan = 3/2) vollkommen transparent gemacht. Die Extinktionswerte der so praeparierten Streifen konnten im Elphor-Handauswertgerät bei ebenfalls manuellem Millimetervorschub direkt abgelesen werden (Abb. 14 b).

Aus den Einzelmessungen beider Auswertmethoden ergaben sich folgende Kurven:

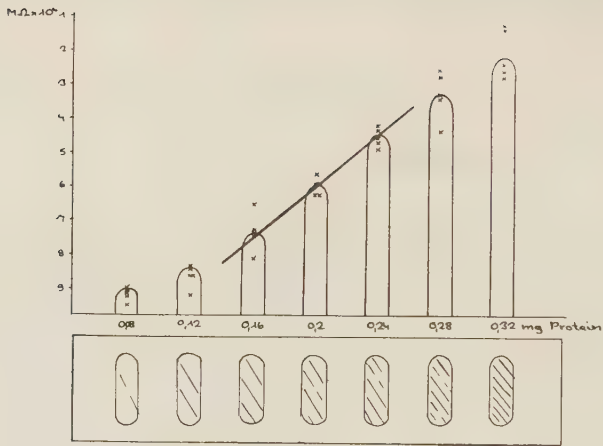


Abb. 14 a elektrometrische Auswertung

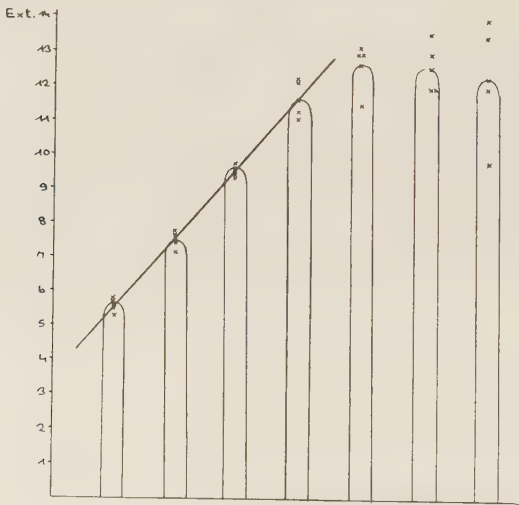
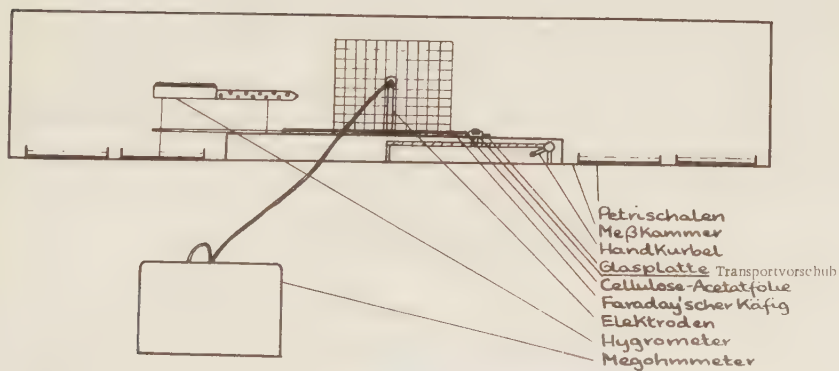
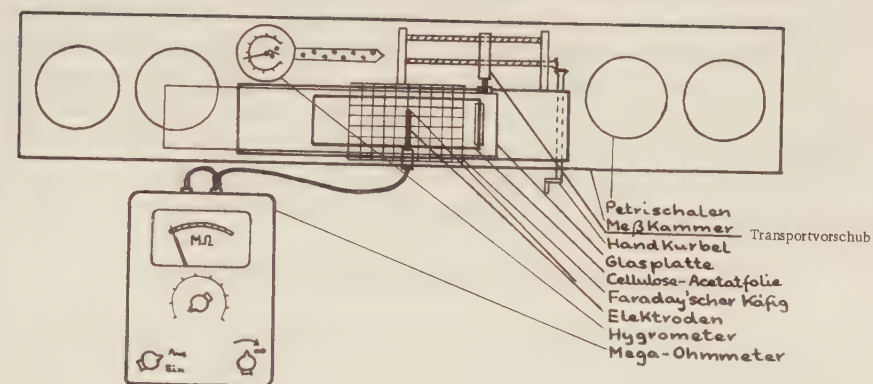


Abb. 14 b photometrische Auswertung



Seitenansicht

Abb. 15 Meßvorrichtung in der Ansicht von oben

Die Eichkurve verläuft bei der elektrometrischen Auswertung in dem Bereich zwischen 0,16 und 0,24 mg Serumprotein linear, die darunter liegenden Eiweißkonzentrationen erscheinen im Verhältnis dazu sehr groß, die darüber liegenden zu klein. Bei der photometrischen Auswertung liegt der lineare Bereich in niedrigeren Konzentrationen, bereits bei 0,08 mg Serumprotein, die höheren Konzentrationen tendieren hier, verglichen mit der elektrometrischen Methode, zu wieder absinkenden Werten. Daraus ist zu ersehen, daß es nicht gleichgültig ist, wie groß die aufgetragene Serumproteinmenge ist.

II ABSOLUTE ALBUMIN- UND GLOBULINLEITFÄHIGKEIT

Nach den oben beschriebenen physikalisch-chemischen Eigenschaften der Serumproteine war es nun interessant zu erfahren, wie sich diese in ihrer Leitfähigkeit zueinander verhielten.

Um mit einer größeren Menge desselben Untersuchungsmaterials arbeiten zu können, wurde bei den folgenden Versuchen das käufliche Rinderalbumin und Rinder- γ -Globulin der Behringwerke verwendet. Zur Einstellung einer gleichmäßigen Ionenkonzentration wurden die Lösungen beider Proteine noch einmal gegen physiologische NaCl-Lösung über 24 Stunden dialysiert und anschließend gefriergetrocknet. Als Ausgangsmaterial diente eine 5%ige Rinderalbumin- bzw. Rinder- γ -Globulinlösung.

Um über einen weiten Bereich eine Beziehung zwischen der Leitfähigkeit des Albumins und Globulins aufstellen zu können, war der Kurvenverlauf nach geringeren Proteinkonzentrationen hin zu verfolgen. Nach mehreren Versuchen erwies sich folgende Konzentrationsreihe als sinnvoll:

5 %ige Alb. - bzw. γ Glob. lösung
Aqua dest.

1:200, 1:150, 1:125, 1:100, 1:80, 1:60, 1:40, 1:20, 1:10, 1:5.

Da bei der Proteinstammlösung das Albumin bzw. γ -Globulin in Ringerlösung gelöst war, erhöhte sich mit steigender Proteinkonzentration in obiger Meßreihe auch jeweils die Konzentration des Lösungsmittels, dessen Salze sicher einen Großteil der Gesamtleitfähigkeit ausmachten. Um auf die absolute Leitfähigkeit des reinen Proteins zu kommen, wurde eine parallele Konzentrationsreihe nur aus dem Lösungsmittel und Aqua dest. hergestellt. Nach Durchmessen der Cellulose-Acetatfolien mit o. a. Konzentrationsreihen konnten für die Albumin-, γ -Globulin- und Ringerlösung folgende Kurven aufgezeichnet werden (Abb. 16 a + b):

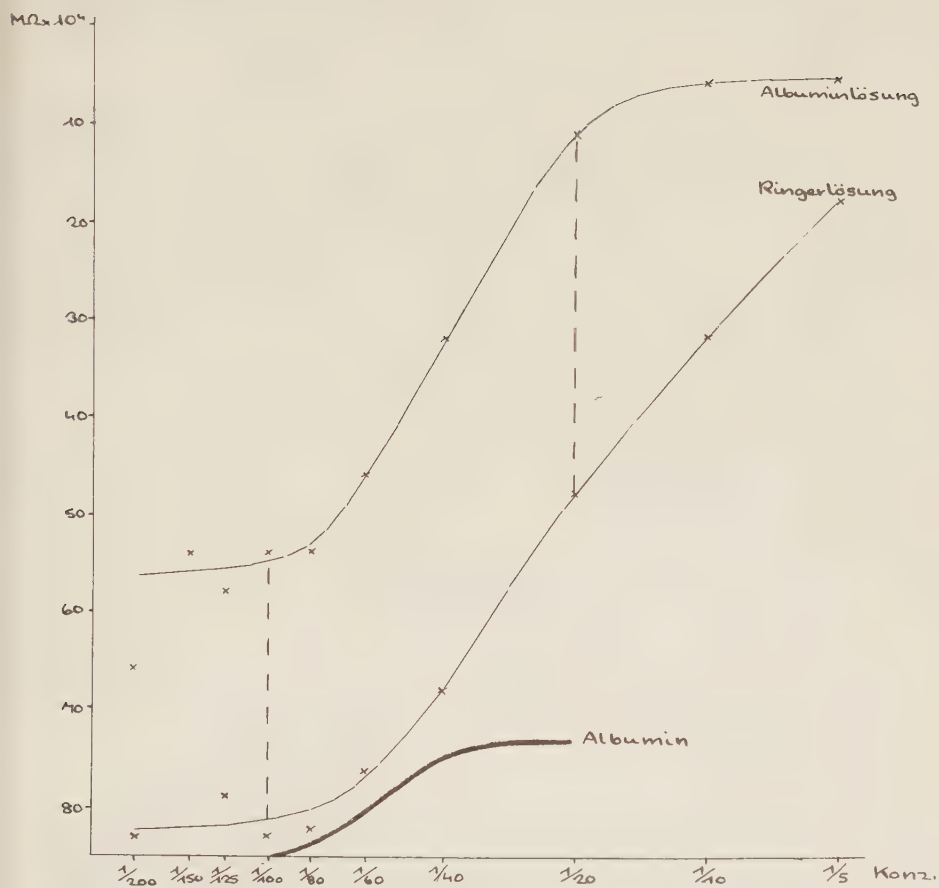


Abb. 16 a Steigende Albumin- und Lösungsmittelkonzentrationen

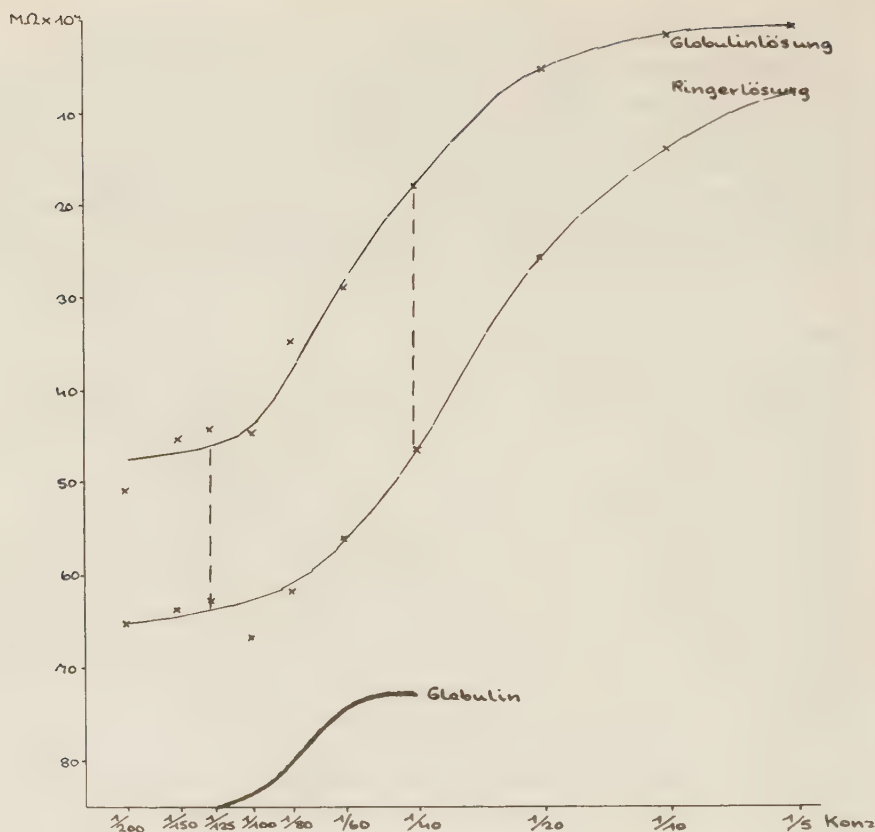


Abb. 16 b Steigende γ -Globulin- und Lösungsmittelkonzentrationen

Durch Bestimmung der Differenz von Proteinlösungskurve und Lösungsmittelkurve ergab sich die absolute Albumin- und γ -Globulinleitfähigkeit. Das erste Drittel zeigte keine Differenz, die Konzentrationen waren hier zu gering, um sich bemerkbar machen zu können. Das Minimum der absoluten Proteinleitfähigkeit lag für Albumin bei der Konzentration 1/100.

Da, wie schon erwähnt, jeweils 0,01 ml der Lösung aufgetragen wurden, entsprach das der Nachweismöglichkeit von 5,5 γ Albumin. Das Maximum der absoluten Albuminleitfähigkeit bei der Konzentration 1/20 entsprach 24 γ Albumin.

Für γ -Globulin lag die minimale absolute Leitfähigkeit bei noch geringerer Konzentration, 1/120, die Kurve stieg im ganzen steiler an, das Maxi-

mum wurde früher erreicht.

Zeichnet man die beiden Proteinkurven in vergrößertem Maßstab zusammen in ein Ordinatensystem, kann man die Werte gut miteinander vergleichen (Abb. 17):

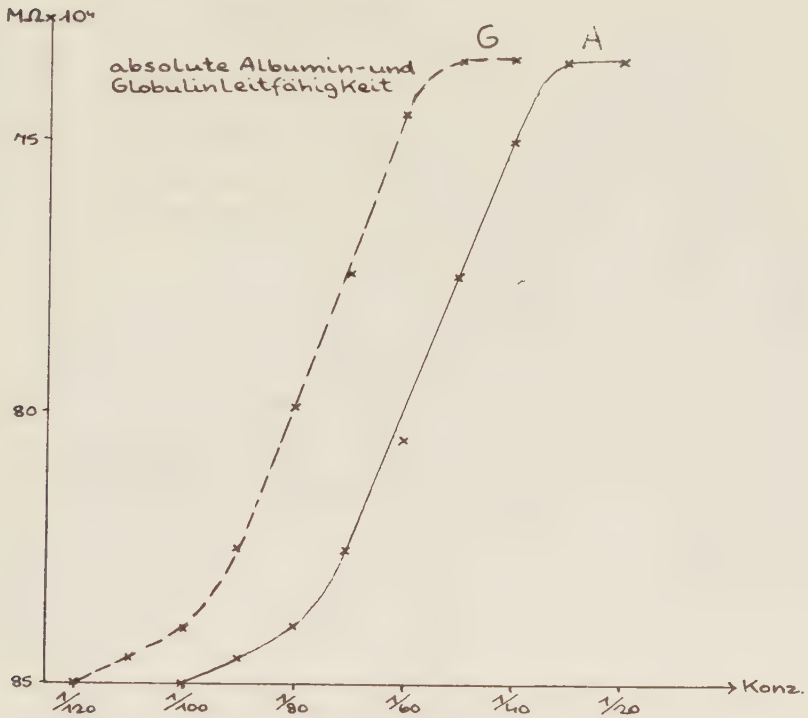


Abb. 17 Absolute Albumin- und γ -Globulinleitfähigkeit

Z. B. liegt bei der Konzentration 1:80 die Leitfähigkeit des Globulins bei 80×10^4 MΩ, die des Albumins bei 84×10^4 MΩ. Parallelversuche erwiesen sich jedoch bis heute, schon allein wegen der differierenden 0-Werte der einzelnen Folien, als nur ungenügend reproduzierbar. Trotz dieses Mangels traten bei mehrfacher Wiederholung die Eigenschaften des Globulins: 1. der steilere Anstieg im linearen Kurvenbereich und 2. die höhere Leitfähigkeit im Gegensatz zu Albumin, immer wieder typisch hervor.

Die Abhängigkeit der Leitfähigkeit von der Luftfeuchtigkeit der Meßkammer wird noch einmal durch folgende Abb. 18 demonstriert:

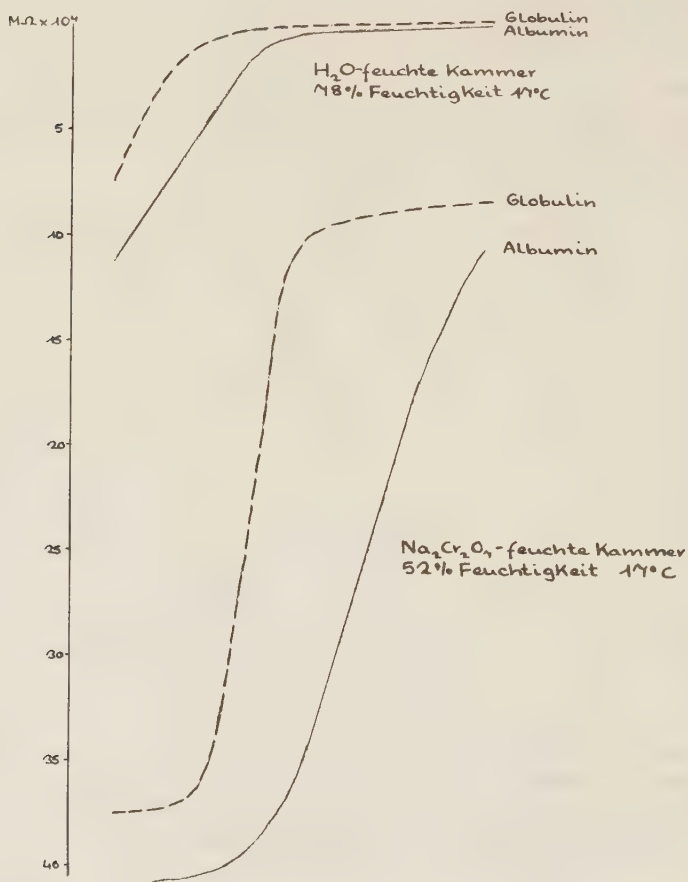


Abb. 18 Abhängigkeit der Widerstandswerte von der Luftfeuchtigkeit der Meßkammer

Dabei wurden dieselben, mit o. a. Konzentrationsreihe Albumin und Globulin beschickten Folien, einmal bei Vollsättigung mit Na₂Cr₂O₇-Lösung und einmal bei Vollsättigung mit H₂O, entsprechend den früher aufgestellten

Eichkurven, gemessen. Bei 52 % Kammerfeuchtigkeit kommt der gesamte Kurvenverlauf von der niedrigsten Konzentration (1/200) bis zur höchsten (1/5) zum Ausdruck; bei 78 % Kammerfeuchtigkeit stellen sich dieselben Konzentrationen mit wesentlich höheren Leitfähigkeitswerten dar.

III AUSWERTUNG VON ELEKTROPHORESESTREIFEN

Eine exakte elektrophoretische Trennung der Serumproteine auf der Cellulose-Acetatfolie ist, wie bei der üblichen photometrischen Auswertung, auch die Grundvoraussetzung für die elektrometrische Auswertung. Nach den noch ungenügenden Erfahrungen mit der Cellulose-Acetatfolie im Routinebetrieb wurde nach mehreren Versuchen, in Anlehnung an die bereits erschienenen Arbeiten (17, 21, 24, 31) folgende Technik für die günstigste gehalten: Auf die in Pufferlösung getränkten und zwischen glattem Filterpapier leicht abgetrockneten Cellulose-Acetatfolien wurde mit einer Mikropipette 0,004 ml Serum aufgetragen. Dabei soll man dem Folienrand nicht näher als 5 mm kommen, da sonst Randverwischungen und ungerade Fronten unvermeidbar sind. Die Auftragstelle befindet sich 10 cm von der Kathode entfernt. Die Elektrophorese erfolgte in der von Grassmann, Hannig und Knedel entwickelten Kammer, bei Zimmertemperatur und einer Spannung von 200 V über 3 Stunden. Um eine zu starke Verdunstung von Pufferflüssigkeit zu vermeiden, wurde der bekannte Michaelis-Puffer von pH 8,6 und der Zusammensetzung von 49,05 g Veronal-Na, 32,38 g Na-Acetat (3 H₂O), 380 ml 0,1 n HCl, Aqua dest. ad 5000 ml im Verhältnis 3:2 mit Aqua dest. verdünnt. Nach beendetem Lauf kamen die waagrecht in ein Metallgestell gespannten Streifen, für 2 - 3 Minuten in einen Trockenschrank mit 100°C. Bis zur elektrometrischen Auswertung wurden sie, um möglichst gleiche Ausgangsbedingungen zu haben, in einem Trockenschrank bei 37°C aufbewahrt.

Dann wurden die Streifen, wie früher beschrieben, in der definiert feuchten Kammer durchgemessen und die Widerstandsänderung je Millimeter am Mega-Ohmmeter abgelesen. Die Werte der Einzelmessungen wurden auf Millimeterpapier aufgezeichnet. Nach Verbindung der Meßpunkte ergaben sich angenähert Gauß-Kurven, deren Basislinie durch Ergänzung der Glockenkurve auf die 0-Linie herab, wie bei der photometrischen Auswertung, korrigiert wurde. Die mit dem Planimeter ermittelten Flächenwerte entsprachen dem Relativanteil der einzelnen Fraktionen, die in das prozentuale Verhältnis zu ihrer Summe (= 100 Relativ-%) zu setzen waren.

Die folgende Tabelle 2 zeigt die Relativ-Werte von 10 willkürlich herausgegriffenen, elektrometrisch gemessenen Cellulose-Acetatfolien mit 10 verschiedenen Normalseren und einen typischen Kurvenverlauf (Abb. 19).

Folie Nr.	Albumin	α_1	Globulin		γ
			α_2	β	
1	27	1,5	8	16	47,5
2	28	2,5	12,5	17	40
3	38	4	11	15	32
4	25,5	7,5	17,5	15,5	44
5	22,5	5	11	14,5	47
6	24,5	5	15	11	44,5
7	32	6	12	13,5	36,5
8	29	3	13	16	39
9	29	4	11	14	42
10	37,5	6	8	13,5	35

Tab. 2 elektrometrisch ermittelte Proteinfractionen von 10 Normalseren

Danach wurden die gleichen 10 Cellulose-Acetatfolien auf die früher angegebene Weise gefärbt, transparent gemacht und photometrisch ausgewertet. Die Mittelwerte der einzelnen Serumproteinfractionen beider Methoden (Tab. 3), sowie ein Beispiel der elektrometrischen und photometrischen Messung und Aufzeichnung ein und desselben Streifens, dessen Ergebnisse den errechneten Mittelwerten am nächsten liegen, seien abschließend gegenübergestellt (Abb. 20 a+b).

Fraktion	Methode	
	elektrometrisch	photometrisch
Albumin	29	74
α_1 -Globulin	4	2,5
α_2 -Globulin	12	4,5
β -Globulin	14	7
γ -Globulin	41	12

Tab. 3 Mittelwerte der relativen Prozente

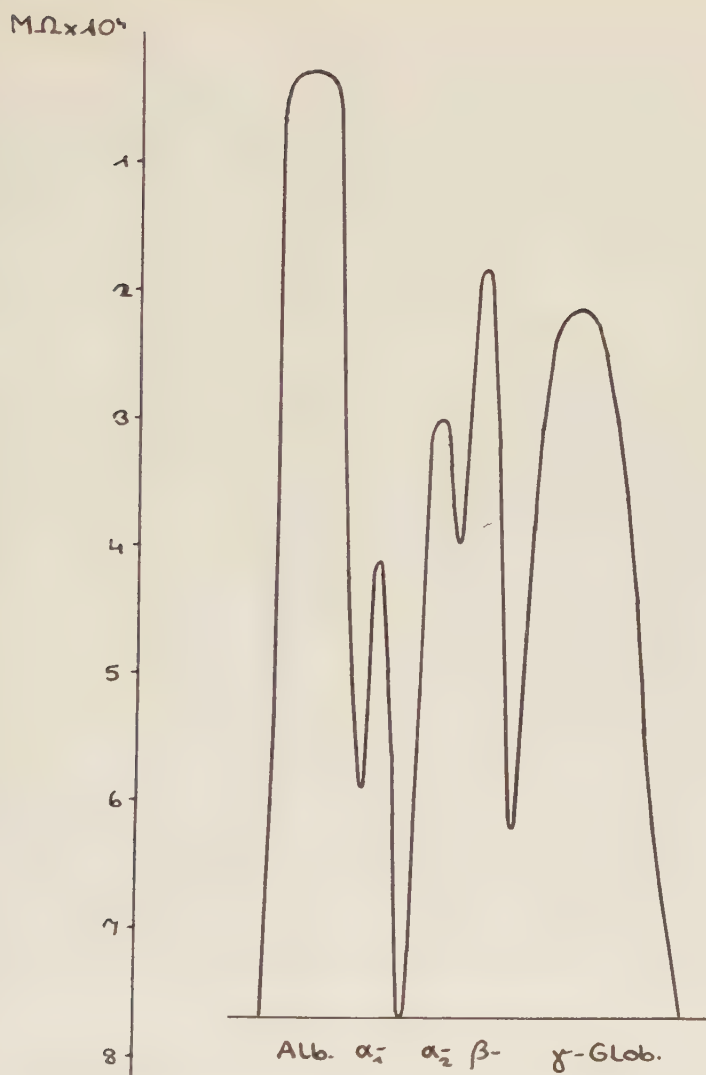
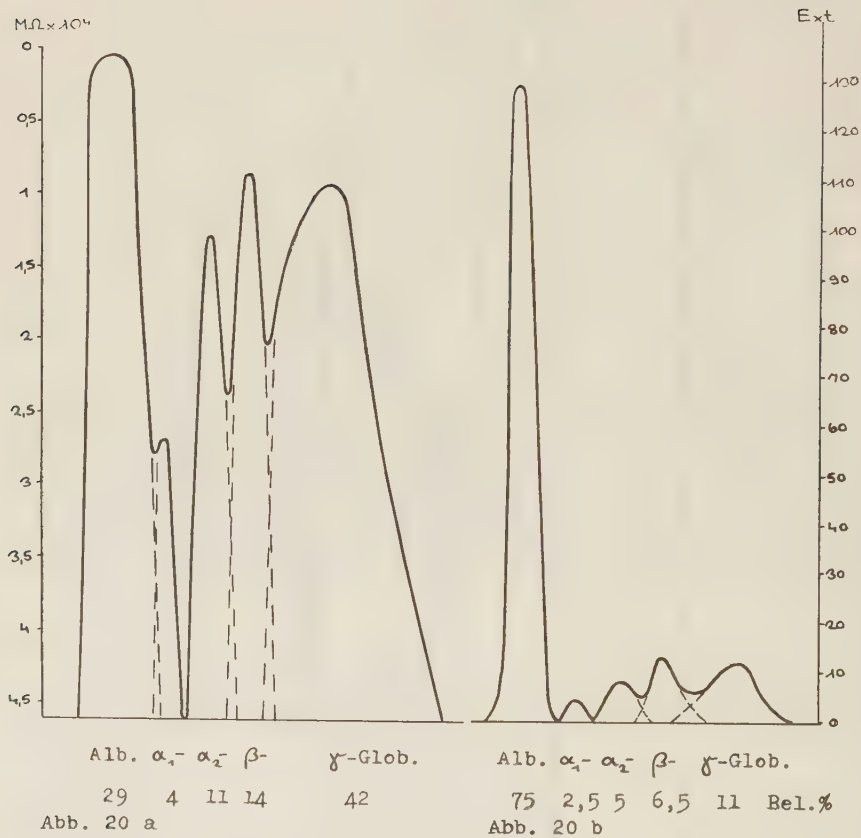


Abb. 19 Elektrometrischer Kurvenverlauf



Gegenüberstellung der elektrometrischen und photometrischen Auswertung

DISKUSSION

De Vries und Hashimoto-Mori (11, 32) beschrieben bereits vor 12 Jahren ein elektrometrisches Meßverfahren. Beide wiesen mit einer einfachen Gleichstrommethode auf Papier getrennte anorganische Stoffe (K, Na, Li, AgNO_3) nach. Dabei lief der trockene Papierstreifen mit konstanter Geschwindigkeit zwischen 2 Stahlrollen durch, die gleichzeitig Antrieb und Elektroden darstellten. Die Leitfähigkeit der Elektrolytzonen im Vergleich zu der leeren Papierfläche machte sich in einer Stromänderung bemerkbar.

Diese Versuche scheinen aber nicht weiter ausgearbeitet worden zu sein.

Bei den Verfahren der genannten Autoren wurde der Durchgangswiderstand gemessen, wobei ein gleichmäßiger Druck der beweglichen Rollen gegeneinander und ein entsprechend gekoppelter Antrieb erforderlich waren.

Für die eigenen Versuche wurde aus rein technisch-apparativen Gründen das Arbeiten mit dem Oberflächenwiderstand bevorzugt. Dabei wurde der auf einer festen Unterlage aufgeklebte Meßstreifen mittels einer handbetriebenen Kurbel unter 2 parallel an einer Halteplatte angebrachten, in sich federnden Cu-Blechelektroden mit punktförmigen Auflageflächen durchgezogen.

War es zunächst das Problem, die Grenze proteinfreies/proteinhaltiges Papier exakt zu erfassen, was dann die Punktelektroden ermöglichten, so ist bei den Ergebnissen zu beachten, daß mit diesen Elektroden, gemäß der früheren Abbildung nur ein Ausschnitt der einzelnen Fraktionen elektrometrisch dargestellt werden konnte. Die mit ihrer ganzen Breite über den Papierstreifen reichenden Federzungenelektroden würden zwar die gesamte Fraktion erfassen, waren aber nicht genügend genau in der Darstellung der Proteingrenzen. Außerdem zeigten sie Widerstandswerte in einem ungünstig niedrigen Meßbereich, während die Papierleerwerte bei den Punktelektroden sehr hoch, im äußersten Meßbereich lagen, was den Vorteil brachte, daß die gesamte Skala des Mega-Ohmmeters für den Leitfähigkeitsnachweis der Serumproteine zur Verfügung stand.

Die Abhängigkeit der Leitfähigkeit von der Luftfeuchtigkeit in der Meßkammer wurde an leeren Papierstreifen demonstriert. Die Einstellung auf eine bestimmte Feuchtigkeit war mit Wasser sehr schnell, innerhalb 2 Stunden zu erreichen, was für den einzelnen Meßvorgang zwar erstrebenswert wäre, doch kam man bei diesem Vorgehen, wegen des hohen Feuchtigkeitsgehaltes von 70 %, schon mit der 0-Linie in einen sehr niedrigen Meßbereich. Ein Beispiel dafür war der allererste Versuch, bei dem noch mit einem Kilo-Ohmmeter gemessen wurde und die Leitfähigkeit der proteinfreien Flächen des mit 1 %iger Essigsäure

angefeuchteten Filterpapierstreifens größer war, als die proteinhaltigen Zonen, die praktisch als Isolator wirkten.

Mit einer kaltgesättigten $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ -Lösung konnte eine konstante Kammerfeuchtigkeit um 53 % (+ 2) eingestellt und auf diese Weise die Leitfähigkeit von proteinfreiem Papier gemindert werden. Daraus ergab sich wiederum eine vorteilhafte, breite Meßskala für die Serumproteine. Allerdings dauert hier die Vollsättigung des Trägermaterials mindestens 7 Stunden, was für den einzelnen Meßvorgang einen großen Zeitaufwand bedeutet.

Auch die Art des Trägermaterials spielte bei unserer Methode eine bedeutende Rolle. Die Leerwerte bei Filterpapier streuten sehr stark, die Cellulose-Acetatfolie dagegen wies nur geringe Schwankungen auf. Eine Arbeit von Pieper (24) trägt zum Verständnis dieser Erscheinung bei: Er fotografierte bei 100-facher Vergrößerung einen Filterpapierstreifen, in dem die gefärbten Eiweißanteile sehr grob und weit verteilt erscheinen (Abb. 21). Auf dem Cellulose-Acetatvergleichsbild ist eine viel feinere und gleichmäßigere Verteilung erkennbar, die eine bessere Auswertung, sowohl auf photometrische Weise, als auch bei unseren Versuchen zur Folge hat. Außerdem erhöht der größere Eigenwiderstand der Cellulose-Acetatfolie gegenüber Filterpapier die Empfindlichkeit der Methode.

Für den elektrometrischen Nachweis der elektrophoretisch getrennten Serumproteine, unter Benutzung von Filterpapier, waren folglich 2 Faktoren ausschlaggebend:

1. das Trägermaterial und 2. die Federzungenelektroden, die beide, wie oben diskutiert, mit ihren Eigenschaften niedrigere Widerstandswerte, mit anderen Worten eine höhere Leitfähigkeit bedingen, als die Eigenleitfähigkeit der Proteine ausmacht. Da es aber gerade darauf ankam, ausschließlich die Leitfähigkeit der Serumproteine herauszustellen, wurden für die weiteren Versuche Punktelektroden und als Träger Cellulose-Acetatfolie gewählt. Außerdem wurde eine mit ca. 53 % konstante Kammerfeuchtigkeit eingestellt.

Den, bei den verschiedenen Packungen, auch oft von Folie zu Folie wechselnden Widerstandswerten, die sich allerdings innerhalb der einzelnen Folie immer in gleicher Höhe hielten, war keine Bedeutung beizumessen, da es sich auch bei den bereits bekannten Auswertmethoden in der Papierlektrophorese im allgemeinen immer um Relativwerte (bezogen auf 100 % Gesamtprotein) handelt.

Obwohl für die einzelnen Fraktionen in der Papierelektrophorese bereits ganz bestimmte physikalisch-chemische Eigenschaften aufgezeigt werden konnten, muß man sich doch vor Augen halten, wie heterogen die Zusammensetzung der menschlichen Serumproteine ist (36): das Serum enthält an die 100 verschiedene Proteine; in der Papierelektrophorese kennt man jedoch nur 18, die mengenmäßig so überwiegen, daß man sie mit einem definierten Reinheitsgrad iso-

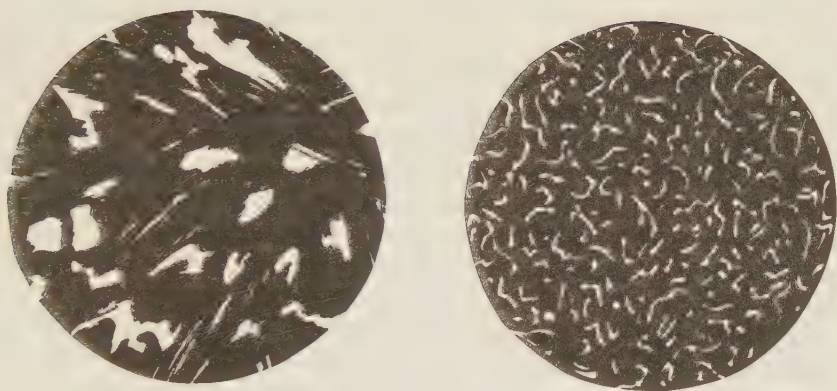


Abb. 21 Eiweißanfärbung auf Filterpapier und Cellulose-Acetatfolie

lieren kann. Daraus folgt, daß die einzelnen Fraktionen noch komplizierte Gemische darstellen und nur deshalb einheitlich erscheinen, weil sie unter bestimmten Bedingungen die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld besitzen.

Gegenüber den bisher geübten Auswertmethoden fallen bei dem elektrometrischen Vorgehen die hohe Leitfähigkeit der γ -Globuline und die niedrige Albuminleitfähigkeit auf, während die Relativwerte von α_1 -, α_2 - und β -Globulin den üblichen Auswertverfahren nahe kommen. Es ist schwer zu beurteilen, welche der genannten Faktoren die jeweils fraktionstypische Leitfähigkeit, speziell die der Albumine und γ -Globuline, ausmachen.

Der unter unseren Arbeitsbedingungen geringere Gesamtladungszustand spricht gegen eine höhere Leitfähigkeit der γ -Globuline gegenüber den Albuminen, das besonders große Dipolmoment dafür. Inwieweit die Größe der Proteinteilchen, verglichen mit der Porengröße der Cellulose-Acetatfolie eine Rolle spielt, läßt sich nicht mit Sicherheit sagen. Man könnte annehmen, daß die kleinen Albuminteilchen in dem Porenvolumen der Cellulose-Acetatfolie aufgenommen werden und so bei der Oberflächenwiderstandsmessung nicht alle erfaßt werden können, die größeren γ -Globulinmoleküle dagegen mehr auf der Oberfläche der Folie liegen bleiben und bei der Messung voll zur Geltung kommen.

Die Überlegungen zu den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Serumproteine werden noch durch die Behandlung der Cellulose-Acetatfolie nach erfolgtem elektrophoretischem Lauf kompliziert. Um das Protein auf der Folie zu fixieren und so ein nachträgliches Verwischen der Fraktionen zu vermeiden, werden die Cellulose-Acetatfolien bei einer Temperatur von 100°C ca. 3 Minuten lang getrocknet. Bei dieser Temperatur findet aber eine Denaturierung = Aufhebung der nativen Eiweißstruktur statt. Dieser Denaturierungseffekt wurde bereits von zahlreichen Autoren (4, 14, 20, 28), die sich bei den photometrischen Auswertverfahren mit der Farbstoffbindung der einzelnen Serumproteinfraktionen befaßten, untersucht. Sie beobachteten, daß die allgemein verwendeten basischen Farbstoffe von Albumin stärker gebunden werden als von Globulin, wobei mit fortlaufender Denaturierung die Anfärbung von γ -Globulin stärker als die des Albumins abnimmt. Als Ursache dafür wird eine größere Hitze-stabilität des Albumins angenommen.

Es ist also nicht ausgeschlossen, daß die Leitfähigkeit der einzelnen Fraktionen ebenfalls von der Denaturierung abhängt.

Schon bei den Versuchen mit Federzungenelektroden, im Verlauf derer die Leitfähigkeit von Albumin und Globulin (gewonnen aus normalem Mischserum mit der bekannten Ammonsulfatfällung nach Kafka) gesondert betrachtet

wurde, fiel die höhere Leitfähigkeit des Globulins gegenüber dem Albumin deutlich auf. Mit steigenden Konzentrationen der viel exakter definierbaren, reineren Rinderalbumin- und Rinder- γ -Globulinlösungen (Behringwerke) fanden diese vorläufigen Versuche mit dem steileren Anstieg des γ -Globulins im linearen Kurvenbereich und der höheren Leitfähigkeit im Gegensatz zu Albumin ihre Bestätigung. Diese Eigenschaft kam in gleicher Weise bei dem elektrometrischen Nachweis der papierelektrophoretisch getrennten Serumproteine zum Ausdruck, deren Mittelwerte aus 10 Normalseren für die Albuminfraktion bei 29 Relativprozent und für die γ -Globulinfraktion bei 41 Relativprozent lagen. Zum Vergleich seien die übrigen Komponenten angeführt: α_1 -Globulin 4, α_2 -Globulin 12, β -Globulin 14 Relativprozent, bezogen auf 100 % Gesamtprotein.

Obwohl in der Papierelektrophorese aufgrund der methodischen Unterschiede in Wanderung und Auswertung, überdies mit der Verwendung von verschiedenen Trägern keine übereinstimmenden Ergebnisse zu erwarten sind, scheint der photometrische Vergleich derselben 10 Cellulose-Acetatfolien doch interessant.

Bemerkenswert sind die bereits von Oriol-Bösch und Voigt (23) herausgestellten Unterschiede der Mittelwerte von photometrisch ausgewertetem Schleicher-Schüll-Filterpapier (SS 2043a) und Cellulose-Acetatfolie (CAF). Beim Vergleich der beiden Trägermedien läßt sich zeigen, daß nach der Elektrophorese auf Cellulose-Acetatfolie die Albuminwerte höher und die γ -Globulinwerte niedriger liegen als bei Filterpapier (SS 2043a: Albumin 53,9 γ -Globulin 19,7 Rel. %, CAF: Albumin 64,3 γ -Globulin 16,3 Rel. %).

Die eigenen photometrisch ermittelten Albuminwerte kommen bei 3-stündigem elektrophoretischem Lauf und einer Spannung von 200 V, in Übereinstimmung mit der von Maier und Voggel (21) beschriebenen Kurzzeitelektrophorese auf Cellulose-Acetatfolie, noch stärker zur Geltung. So steht nach der früher aufgezeichneten Tab. 3 die photometrische Auswertung mit Albumin = 74 Rel. % und γ -Globulin = 12 Rel. % der elektrometrischen Auswertung mit Albumin = 29 Rel. % und γ -Globulin = 41 Rel. % gegenüber. Daraus geht klar hervor, daß es nicht möglich ist, Ergebnisse verschiedener Auswertmethoden miteinander zu vergleichen. Es können aber für jede Methode unter Einhaltung konstanter Versuchsbedingungen und weitgehender Elimination von störenden Faktoren bestimmte Bezugswerte aufgestellt werden, die, sind sie einmal bekannt, für eine routinemäßige Auswertmethode in der Papierelektrophorese ihren Zweck erfüllen.

Mit dieser Arbeit sollte nicht nur auf eine neue Auswertmöglichkeit hingewiesen, sondern auch der Weg zu einer einfacheren, zeitsparenden Methode aufgezeigt werden.

Hitzig (12) veranschlagt für die Durchführung einer einzelnen Papierelektrophorese (in einer Serie von 8 - 10 Stück) mit der photometrischen Auswertung

60 - 90 Minuten Arbeitszeit.

Bei dem elektrometrischen Verfahren fällt bereits der zeitraubende Färbeprozess weg. Um das langwierige Aufzeichnen der einzelnen Widerstandswerte, das Planimetrieren der Kurven und Ausrechnen der Ergebnisse zu umgehen, besteht zudem die Möglichkeit, ähnlich den automatischen Auswertgeräten in der Photometrie, ein solches für die automatische Aufzeichnung der Widerstandswerte und gleichzeitiges Integrieren der Kurven zu entwickeln.

ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit einer neuen Auswertmöglichkeit in der Papierelektrophorese. Mit einer geeigneten Apparatur konnte unter konstanten Bedingungen die Leitfähigkeit der auf Cellulose-Acetatfolie aufgetragenen bzw. elektrophoretisch getrennten Serumproteine gemessen werden. Die Meßvorrichtung besteht aus zwei feststehenden, in sich federnden Cu-Blech-Elektroden mit punktförmiger Auflagefläche und einem mittels Hand betriebenen Transportgerät, auf dem die aufgeklebten Meßstreifen millimeterweise unter den Elektroden durchgezogen werden. Eine störungsfreie Messung wird durch einen über das Meßgut und die Elektroden gesetzten Faraday'schen Käfig gewährleistet. Diese Apparatur befindet sich in einer luftdicht abgeschlossenen Kammer, darin sorgen mit kaltgesättigter Na-dichromatlösung gefüllte Petrischalen für eine genau definierte Luftfeuchtigkeit, die für die Leitfähigkeit der Serumproteine maßgebend ist. Die Leitfähigkeit bzw. Widerstandswerte werden von einem Megohmmeter abgelesen, die einzelnen Meßpunkte aufgezeichnet und miteinander verbunden. Nach planimetrischer Auswertung der auf diese Weise erhaltenen Kurven kommen Albumin mit 29, α_1 -Globulin mit 4, α_2 -Globulin mit 12, β -Globulin mit 14 und γ -Globulin mit 41 Relativprozent zur Darstellung. Welche physikalisch-chemischen Eigenschaften die fraktionstypische Leitfähigkeit ausmachen, ist nicht mit Sicherheit zu sagen. Es wurden die Mittelwerte aus 10 Normalseren bestimmt und mit der photometrischen Auswertmethode verglichen. Die Versuche zeigen, daß der elektrometrische Nachweis der Serumproteine grundsätzlich möglich ist. Bei entsprechender apparativer Vervollkommenung der noch weitgehend improvisierten Meßanordnung, insbesondere im Hinblick auf die Automation, könnte sich die Elektrometrie als vorteilhaft für die routinemäßige Auswertung der Serumelektrophorese erweisen.

LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Antweiler H. J. : Die quantitative Elektrophorese in der Medizin,
Springer-Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg
1952
- (2) Behringwerk-Mitteilungen:
Heft 43, N.G. Elwert, Universitäts- u. Verlags-
buchhandlung Marburg/Lahn 1964: Einige neuere
analytische Methoden zur Charakterisierung der
Plasmaproteine
- (3) Block, R., E. L. Durrum, G. Zweig:
Paper Chromatography and Paper Electrophoresis,
2. Auflage Academic Press, New York 1958
- (4) Brand E., J. T. Edsall: Ann. Rev. Biochem. 16, 223 (1947)
- (5) Chemla M.: J. Chromatogr. 1, 2-23 (1958)
- (6) Consden R., A. Gordon, A. Martin:
Biochem. J. 38, 224 (1944)
- (7) Dittmer A.: Papierelektrophorese, Grundlagen-Methodik-
Klinik, 2. Auflage, VEB Gustav Fischer Verlag,
Jena 1961
- (8) Grassmann W., K. Hannig, M. Knedel:
Dtsch. med. Wschr. 76, 333 (1951)
- (9) Grassmann W., K. Hannig:
Klin. Wschr. 32, 838 (1954)
- (10) Grüttner R.: Klin. Wschr. 32, 263 (1954)
- (11) Hashimoto, Mori: Nature 172, 542 (1953)
- (12) Hitzig W. H. : Die Plasmaproteine in der klinischen Medizin,
Springer-Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg
1963
- (13) Hoyer H. W., K. J. Mysels, D. Stigter:
J. Physic. Chem. 58, 385 (1954)
- (14) Jencks W. P., M. R. Jetton, E. L. Durrum:
Biochem. J. 60, 205 (1955)

- (15) Karlson P. : Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner u. Naturwissenschaftler, 2. Auflage, Georg Thieme-Verlag Stuttgart 1961
- (16) Klobusitzky v. D. , P. König:
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmakol. 192, 271 (1939) Biochem. Studien über die Gifte der Schlangengattung Bothrops.
- (17) Kohn J. : Clin. Chim. Acta 2, 297 (1957)
- (18) Lerch P. , S. Neukomm: Schweiz. med. Wschr. 84, 515 (1954)
- (19) Leuthardt F. : Lehrbuch der physiol. Chemie, 15. Auflage, Walter De Gruyter u. Co, Berlin 1963
- (20) Lorenz K. : Klin. Wschr. 40, 527 (1962)
- (21) Maier K. H. , K. Voggel: GIT 2, 7 (1964)
- (22) Oehme F. : Angewandte Konduktometrie, Dr. A. Hüthig Verlag GmbH, Heidelberg (1961)
- (23) Oriol-Bosch A. , K. D. Voigt:
Klin. Wschr. 37, 758 (1959)
- (24) Pieper J. : Klin. Wschr. 39, 1293 (1961)
- (25) Rapoport S. M. : Medizinische Biochemie, Lehrbuch für Studierende und Ärzte, 2. Auflage, VEB Verlag Volk u. Gesundheit, Berlin 1964
- (26) Röttger H. : Klin. Wschr. 31, 85 (1953)
- (27) Röttger H. : Ärztl. Labor 1, 58 (1956)
- (28) Scheurlen P. G. : Verh. dtsh. Ges. inn. Med. 66, 586 (1960)
- (29) Semm K. , R. Fried: Naturwiss. 39, 326 (1952)
- (30) Svedberg T. , K. O. Pedersen:
Die Ultrazentrifuge, Steinkopf Dresden u. Leipzig 1940
- (31) Technische Mitteilungen der Fa. Carl Schleicher u. Schüll,
Dassel Krs. Einbeck
- (32) Vries De G. : Nature 173, 735 (1954)

- (33) Wieland Th., E. Fischer, L. Wirth:
Z. angew. Chem. 62, 31, 473 (1950)
63, 171 (1951)
- (34) Wuhrmann F., H.H. Märki:
Dysproteinämien und Paraproteinämien,
Grundlagen, Klinik, Therapie
4. Auflage der "Bluteiweißkörper des Menschen",
Verlag Schwabe u. Co.
Basel/Stuttgart 1963
- (35) Wuhrmann F., Ch. Wunderly:
Die Bluteiweißkörper des Menschen,
3. Auflage, Benno Schwabe u. Co. Verlag,
Basel/Stuttgart 1957
- (36) Wunderly Ch.:
Die Papierelektrophorese, Methoden u. Ergebnisse,
2. Auflage, Verlag H.R. Sauerländer
u. Co. Aarau und Frankfurt/M. 1959

LEBENS LAUF

Am 2. 4. 1937 wurde ich als Tochter des Kaufmanns Hermann Voigt und seiner Ehefrau Gertrud, geb. Dieck in Hannover geboren.

Noch im selben Jahr zogen meine Eltern nach München. Während des Krieges wurden wir nach Osterode/Harz evakuiert, wo ich 1944 in die Volksschule eintrat. Wieder nach München zurückgekehrt, besuchte ich die 4. Volksschulklasse und wurde 1948 in das Mädchen-Realgymnasium München-Pasing aufgenommen, das ich mit der mittleren Reife verließ. Nach einem Jahr Fraueneinfachschule und bereits begonnener Ausbildung als medizinisch-technische Assistentin entschloß ich mich zum Medizinstudium. 1957 legte ich eine Aufnahmeprüfung in die 9. Klasse des Mädchen-Realgymnasiums München-Nord ab und bestand an dieser Schule 1958 das Abitur. Seit dem Wintersemester 1958 studierte ich an der Universität München Medizin. 1959 legte ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung, 1961 die ärztliche Vorprüfung und im April 1965 das Staatsexamen ab. Nach 8 Monaten Medizinalassistentenzeit an der II. Medizinischen Klinik der Universität München bin ich jetzt an der Chirurgischen Abteilung der Universitäts-Kinderklinik als Medizinalassistentin tätig.

